UNIVERSITE PARIS VI

FACULTE DE MEDECINE SAINT-ANTOINE

-=-=-=-=-=-=-

Année 1972 N°

THESE

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

par

Dominique FICHET

né le 23 octobre 1945 à CHARTRES (28)

Interne des Hôpitaux de PARIS

Présentée et soutenue publiquement le 1972

CONTRIBUTION A LA CARACTERISATION DE L'ACIDE HYALURONIQUE DANS LES EPANCHEMENTS DES SEREUSES CŒLOMIQUES

Président : Monsieur Louis ORCEL, Professeur

UNIVERSITE PARIS VI

FACULTE DE MEDECINE SAINT-ANTOINE

Année 1972 N°

THESE

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

par

Dominique FICHET

né le 23 octobre 1945 à CHARTRES (28)

Interne des Hôpitaux de PARIS

Présentée et soutenue publiquement le 1972

CONTRIBUTION A LA CARACTERISATION DE L'ACIDE HYALURONIQUE DANS LES EPANCHEMENTS DES SEREUSES COELOMIQUES

Président : Monsieur Louis ORCEL, Professeur

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE PARIS VI

FACULTE DE MEDECINE SAINT-ANTOINE

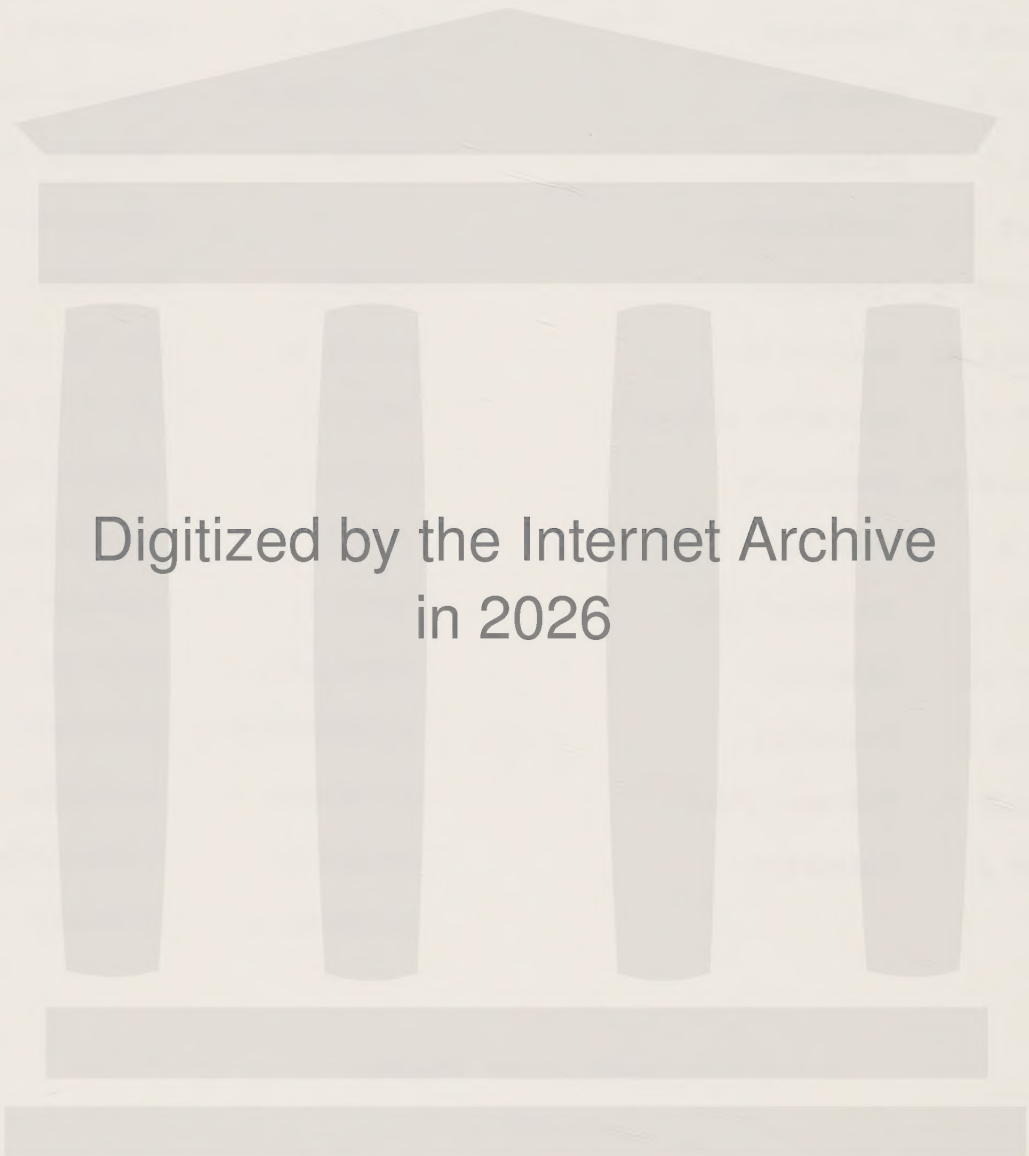
-=-=-=-=-

Professeurs Titulaires

MM.	ANDRE R.	Hématologie	MM.	HUGELIN A.	Physiologie
	BRISSAUD H.	Pédiatrie		LAPLANE R.	Pédiatrie
	BROCARD R.	Médecine		LE LORIER G.	Obstétrique
	CAROLI J.	Médecine		LOEPER J.	Médecine Expérimentale-
	CATINAT J.	Cardiologie			Immunologie
	CERBONNET G.	Chirurgie		LOYGUE J.	Chirurgie
	CHERIGIE Ed.	Radiologie		MAROIS M.	Histologie
	CHIGOT P.L.	Chirurgie Infantile		MERGER R.	Obstétrique
	CONTAMIN Fr.	Neurologie		MILHAUD G.	Bipphysique
	CONTE M.	Médecine		NICK J.	Neurologie
	DAGUET L.	Bactériologie		ORCEL L.	Anatomie Pathologi que
	DEBRAY J.	Médecine		PERRAULT M.	Médecine
	FLABEAU F.	Chirurgie		POLONOVSKI Cl.	Pédiatrie
	GERBEAUX J.	Thérapeutique		POLONOVSKI J.	Biochimie
	GOSSET J.	Chirurgie		RICHET G.	Néphrologie
				WOLFROMM R.	Médecine

Professeurs sans Chaire

MM.	BRICOUT F.	Bactério-Virologie	MM.	GOLVAN Y.J.	Parasitologie
	CHALUT J.	Radiologie		LESTRADET H.	Pédiatrie
Mme	CHAPUT A.	Stomatologie		PICARD J.	Biochimie
MM.	DUHAMEL G.	Hématologie		ROUX Ch.	Embryologie
	GIRARD F.	Physiologie			


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543517_0083

Maîtres de Conférences

MM.	AKOUN G.	Médecine	MM.	LASFARGUES G.	Pédiatrie
	ARDAILLOU R.	Physiologie		LAUGIER A.	Radiologie
	BAUX S.	Chirurgie		LEVY V.G.	Médecine
	BOURY G.	Chirurgie		MALAFOSSE M.	Chirurgie
	CHEYMOL G.	Pharmacologie		MENSCH B.	Biophysique
	CHOUARD Cl.	O.R.L.		MERY J. Ph.	Néphrologie
	CLOAREC M.	Médecine	Mme	MIGNON Fr.	Néphrologie
Mme	COMBRISSON A.	Hématologie	MM.	OPOLON J.	Médecine
MM.	COSCAS G.	Ophtalmologie		PAQUELIN Fr.	O.R.L.
	DAUTRY P.	Chirurgie		PIERON R.	Médecine
	DECROIX G.	Pneumo-Phtisiologie		PISSARRO B.	Médecine Préventive
	DELIGNE P.	Anesthésiologie		POULET J.	Médecine
	DOYON D.	Radiologie		RAMPINI Cl.	Biochimie
	DRY J.	Médecine		RICHARDET J.M.	Pédiatrie
	FOUET P.	Thérapeutique		ROLAND J.	Anatomie-Pathologique
	GAUTIER H.	Physiologie			
	GRUNER M.	Chirurgie Infantile		SALAT J.	Obstétrique
	GUILMET Cl.	Anesthésiologie		SALMON Ch.	Hématologie
	GUIRAUDON G.	Anatomie		SANTARELLI J.	Obstétrique
	HERMAN D.	Médecine		WARGON H.	Médecine Expérimentale
	HUGUET Cl.	Chirurgie			
	HUGUIER M.	Chirurgie		WEINMANN S.	Biochimie

Enseignants Associés

Professeur Associé	M.	BLOCH-MICHEL H.	Rhumatologie
M. C. A. Associé	M.	ELIAKIS Em.	Médecine Légale

Enseignants Contractuels

M. C. A.	M. KIRSCH F.	Physiologie biochimique

Chargés d'Enseignement

MM.	BENOIST	Rhumatologie	MM.	DUNET	Endocrinologie
	BRUEZIERE	Chirurgie Infantile		LOFFREDO	Obstétrique
	CRISTOL	Cardiologie		SALOMON	Rhumatologie

Attachés d'Enseignement

MM.	CASASSUS	Cardiologie	MM.	HIVET	Chirurgie
	COUVREUR	Thérapeutique		MIGNOT	Neurologie
	DES LAURIERS	Neurologie		SAUVAN	Cardiologie
	GALLOUEDEC	Pneumologie		VANNIER	Pneumologie

A MES PARENTS,

A MES BEAUX-PARENTS,

A MA FEMME,

A MES ENFANTS.

A notre Maître le Professeur Louis ORCEL

Professeur à la Faculté de Médecine Saint-Antoine

Chef du Service Central d'Anatomie-Pathologique

Qui nous a fait le très grand honneur d'accepter la Présidence de cette thèse.

Il nous a confié ce travail, mené à bien grâce à ses conseils bienveillants.

En témoignage de notre respectueuse gratitude.

A Monsieur le Professeur Jean CATINAT

Il a été le guide du début de notre Internat
Qu'il trouve ici le témoignage de toute
notre reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Agr. Guy DECROIX

Il a inspiré notre vocation clinique future,
nous a fourni une observation privilégiée.
En témoignage de notre fidèle et respectueux
attachement.

A Monsieur le Professeur Agr. Henri WARGON

Qui nous a confié une charge d'enseignement
en Immunologie.
Qu'il trouve ici l'assurance de notre
respectueuse amitié.

A mes Maîtres.

Stagiaire : Pr J. PATEL (In memoriam)

Pr J. BARIETY (In memoriam)

Pr M. ROUX

Pr J. TURPIN

Externat : Pr J. PATEL (In memoriam)

Pr J. MATHEY

Pr R. KOURILSKY

Pr Agr. G. DECROIX

Dr R. PERROT

Pr S. de SEZE

Pr Agr. J. LEVY

Internat : Pr J. CATINAT

Pr M. DEROT

Pr L. ORCEL

Pr Agr. G. DECROIX

A Monsieur le Docteur Michel JAGUEUX

Qui a grandement collaboré à ce travail.
Qu'il trouve ici l'assurance de toute
notre amitié.

A tous les Collaborateurs et Collaboratrices du
Service Central d'Anatomie-Pathologique, en particulier à
Madame SEBBAGH et à Mademoiselle BISCAR,
dont la collaboration nous a été précieuse.

INTRODUCTION

La sécrétion d'acide hyaluronique par les tumeurs malignes primitives de la plèvre est maintenant une chose bien établie.

Depuis MEYER et CHAFFEE, en 1940, qui, les premiers, ont mis en évidence ce mucopolysaccharide, de nombreux progrès ont été enregistrés, liés à l'amélioration des techniques de dosage biochimique.

TRUEDSSON (1951), BLIE (1951), DWOSKIN (1954), DARNIS et FAUVERT (1956), WINSLOW et RAYLOR (1960), ont rapporté de nombreuses observations, relatives à des mésothéliomes pleuraux, péritonéaux et péricardiques malins.

WAGNER, MUNDAY et HARRINGTON ont, les premiers, mis en évidence l'acide hyaluronique dans les fragments tumoraux par le test à l'Hyaluronidase (1962).

HARRINGTON, WAGNER et SMITH (1963) ont dosé l'acide hyaluronique dans 27 liquides pleuraux provenant de mésothéliomes confirmés. Seuls les liquides visqueux ont été positifs, les liquides non visqueux ne contenant que peu d'acide hyaluronique, des techniques plus précises étant indispensables pour le mettre en évidence.

Plus tard, de nombreux auteurs vont s'attacher à doser l'acide hyaluronique dans les épanchements non visqueux : HAVEZ et Coll. (1965), DUTHOIT (1966), RASMUSSEN et Coll. (1967), BOERSMA (1970). Ce dernier a confirmé pleinement la Thèse de DUTHOIT, en utilisant une technique à deux étapes :

1°) Etape électrophorétique : qui permet, dans la mesure où le malade n'est pas au traitement antimitotique, d'affirmer ou d'infirmer la présence d'acide hyaluronique. Cette méthode ne permet pas de doser des quantités d'acide hyaluronique inférieures à 15 mg par litre.

2°) Etape chromatographique : permettant de mettre en évidence de très faibles quantités d'acide hyaluronique, soit qu'il s'agisse d'un mésothéliome à différenciation fibreuse, soit d'un malade soumis au traitement antimitotique.

Toutes les techniques rapportées font état de méthodes biochimiques. Seul CASTELAIN signale des techniques cytochimiques de mise en évidence de l'acide hyaluronique, WAGNER et Coll. des techniques histochimiques; mais ils ne semblent pas leur accorder un caractère spécifique.

Par contre, JAGUEUX et PIERON ont rapporté, en 1971, une étude portant sur 12 mésothéliomes de localisation pleurale et 2 de localisation péricardique, dans lesquels ils ont mis en évidence l'acide hyaluronique par des methodes histochimiques. 8 liquides pleuraux appartenant à la même série ont également permis de mettre en évidence l'acide hyaluronique sur les blocs d'inclusion des liquides. Ils n'ont échoué que dans un cas de mésothéliome à différenciation fibreuse.

Le travail actuel a été le suivant :

1°) Reprendre 4 liquides de mésothéliomes pleuraux, certains histologiquement, dont pour certains nous avons pu obtenir les dosages d'acide hyaluronique dans le liquide.

2°) Prendre 19 liquides témoins, provenant d'épanchements pleuraux et péritonéaux d'étiologies diverses, sur lesquels la même technique a été appliquée.

Son but était d'apporter éventuellement d'utiles renseignements sur le diagnostic des tumeurs malignes primitives de la plèvre, par mise en évidence de l'acide hyaluronique à l'aide de techniques cytochimiques.

METHODES UTILISEES

Tous les échantillons de liquides pleuraux et péritonéaux ont été soumis au même protocole, sauf 2 qui ont été repris dans les archives du Service, qui étaient fixés au liquide de Bouin.

1°) Recueil du liquide pleural sur anticoagulant (citrate; l'Héparine n'a pas été retenue car il s'agit d'un mucopolysaccharide acide).

2°) Transport le plus rapide possible au Laboratoire.

3°) Centrifugation à 1.500 tours/minute, pendant 1/4 d'heure.

4°) Fixation par le fixateur de Lillie (formol-nitrate de Pb-alcool).

5°) Nouvelle centrifugation (5 minutes).

6°) Inclusion en paraffine du culot de centrifugation fixé.

7°) Le protocole cytochimique comprend ensuite un Hématoxyline-Phloxine-Safran de contrôle, puis :

a. Une étude de la métachromasie à différents pH (1,5, 2,5, 3,5), au bleu de toluidine.

b. Une coloration par le Bleu Alcian à 2 pH : 1 et 2,5.

c. Réaction au fer colloïdal, suivant la technique de Müller Mowry, élective vis-à-vis des substances mucopolysaccharides carboxyliques seules.

d. Epreuve de digestion par l'hyaluronidase testiculaire suivie d'un Bleu Alcian à pH 2,6. La coloration est jugée par rapport à la coupe témoin (b) et par rapport à une coupe laissée dans le tampon.

e. Une réaction à la fuschine paraldéhyde, pour mettre éventuellement en évidence les chondroïtines sulfatés.

8°) Enfin, 5 lames ont été colorées au Bleu Alcian, après hydrolyse acide, afin de visualiser une hydrolyse éventuelle de l'acide sialique.

MATERIEL D'ETUDE

Il comporte 23 liquides, répartis comme suit :

- 19 liquides de plèvre, dont 4 proviennent de mésothéliomes certains, identifiés histologiquement.
- 4 liquides d'ascite.

Nous avons exigé, dans tous les cas, un diagnostic clinique certain, en particulier dans les cas de pleurésie secondaire à un cancer viscéral primitif (dans 1 observation, le diagnostic est incertain, mais, nous avons eu le dosage de l'acide hyaluronique dans le liquide).

Les liquides se répartissent ainsi :

- 5 liquides proviennent de pleurésies tuberculeuses.
- 2 liquides (un de plèvre, un d'ascite), sont des liquides d'épanchements secondaires à un épithélioma bronchique primitif.
- 5 liquides proviennent d'épithéliomas digestifs muco-sécrétants.
- 2 liquides métastatiques d'épithéliomas papillaires végétants de l'ovaire.
- 1 liquide métastatique d'un sarcome primitif de la cuisse.
- 1 pleurésie purulente.
- 1 liquide métastatique d'un séminome testiculaire.
- 1 liquide métastatique d'un adénocarcinome mammaire.
- 1 pleurésie hémorragique maligne, primitivement étiquetée mésothéliome sur une biopsie pleurale. Mais le dosage de l'acide hyaluronique s'est révélé négatif (inférieur à 15 mg).
- 4 liquides de mésothéliomes certains, tous quatre vérifiés par biopsie chirurgicale, 2 d'entre eux ayant été confirmés par vérification anatomique. Le dosage d'acide hyaluronique de ces liquides était respectivement (pour 3 d'entre eux) : 118 mg/l, 106 mg/l et 72 mg/l, ce qui est tout à fait suffisant pour confirmer le diagnostic de mésothéliome.

OBSERVATIONS PERSONNELLES

Obs. N° 1 - Liquide de plèvre

Malade d'une cinquantaine d'années, désarticulé et amputé du membre inférieur droit pour un sarcome de la cuisse. Ce malade présentait une métastase du hile pulmonaire droit et un épanchement pleural droit séro-fibrineux.

Les éléments cellulaires de ce liquide sont peu nombreux, essentiellement lymphocytaires. Il n'est pas observé de cellules malignes.

Les colorations histochimiques ont donné les résultats suivants (cf. tableau).

Aucun mucopolysaccharide n'a été mis en évidence par les techniques cytochimiques employées au niveau des cellules de ce liquide.

Obs. N° 2 - Liquide de plèvre

Malade de 70 ans, présentant :

1°) Un cancer du colon gauche

2°) Une pleurésie hémorragique de la base gauche, manifestement métastatique.

Le culot est très richement cellulaire. A côté de lymphocytes, polynucléaires, il existe des groupes de cellules manifestement malignes, dont certains se groupent autour d'une cavité réalisant un aspect glandulaire. Ces cellules, dont certaines sont binucléées, présentent parfois une vacuole intracytoplasmique arrondie.

Les colorations cytochimiques ont donné les résultats suivants (cf. tableau).

Tableau Obs. N° 1

Métachromasie	pH 1,5	-
	pH 2,5	-
	pH 3,5	-
Bleu Alcian	pH 1	-
	pH 2,5	-
Müller Mowry		-
Fuschine paraldéhyde		-
Bleu Alcian	Témoin	-
	Hyaluronidase	-

Tableau Obs. N° 2

Métachromasie	pH 1,5	-
	pH 2,5	-
	pH 3,5	-
Bleu Alcian	pH 1	++
	pH 2,6	++
Fuschine paraldéhyde		-
Bleu Alcian pH 2,6	Témoin	++
	Hyaluronidase	++
Fer colloïdal		++

- La fuschine paraldéhyde est négative.
- Les deux Bleu Alcian sont positifs; ils colorent d'une part les membranes des cellules néoplasiques, d'autre part et à pH 1 des vacuoles intracytoplasmiques.
- Le fer colloïdal colore intérieurement les membranes et les vacuoles intracytoplasmiques.
- La hyaluronidase ne va pas digérer ces substances alcianophiles.

Obs. N° 3 - Liquide d'ascite

Il s'agit d'un malade de 47 ans, porteur d'un cancer bronchique primitif, avec liquide pleural séro-hémorragique. Le malade présentait également un foie secondaire et une ascite manifestement néoplasique. La cytologie est polymorphe.

Sa composante inflammatoire comprend des polynucléaires et des lymphocytes non altérés. Il existe une abondante composante mésothéliale.

Les colorations histochimiques vont montrer, au niveau des cellules mésothéliales :

- Fuschine paraldéhyde : négative
- Le Bleu Alcian est négatif à pH 1; positif à pH 2,6 au niveau des cellules mésothéliales, mais très faiblement.
- Mais il n'y a pas de digestion par la hyaluronidase.
- Le fer colloïdal est franchement positif.
- Il n'a pas été observé de métachromasie.

Tableau Obs. N° 3

Métachromasie	pH 1,5	-
	pH 2,5	-
	pH 3,5	-
Bleu Alcian	pH 1	-
	pH 2,5	+
Fer colloïdal		++
Bleu Alcian pH 2,6	Témoin	+
	Hyaluronidase	+
Fuschine paraldéhyde		-

Tableau Obs. N° 4

Métachromasie	pH 1,5	-
	pH 2,5	-
	pH 3,5	-
Bleu Alcian pH 2,6	Témoin	++
	Hyaluronidase	++
Bleu Alcian	pH 1	++
	pH 2,5	++
Fuschine paraldéhyde		-
Müller Mowry		++

Obs. N° 4 - Liquide d'ascite

Malade porteur d'une néoplasie digestige colique.

Le frottis montre, à côté d'éléments inflammatoires, lymphocytes, polynucléaires non altérés, et de quelques éléments mésothéliaux, l'existence de cellules manifestement malignes, dont certaines sont groupées autour de cavités.

Les colorations cytochimiques montrent :

1) La fuschine paraldéhyde est négative.
2) Au niveau des éléments cellulaires malins, il y a une alcianophilie tant à pH 1 qu'à pH 2,6.
3) Cette alcianophilie persiste après action de la hyaluronidase.
4) Le fer colloïdal est positif sur ces mêmes éléments.
5) La métachromasie n'a rien donné.

Obs. N° 5 - Liquide d'ascite

Ce malade, âgé de 66 ans, était porteur d'un épithélioma gastrique, de type lieberkühnien, confirmé par la fibroscopie et la gastrobiopsie.

Le frottis comporte :

1°) Une composante inflammatoire, faite de lymphocytes, polynucléaires non altérés.
2°) Une composante mésothéliale.
3°) Quelques volumineuses cellules dont certaines comportent une vacuole centrale.

On ne peut affirmer formellement la malignité.

La paroi de ces éléments cellulaires est discrètement alcianophile à pH 1, ainsi qu'à pH 2,6.

Cette alcianophilie ne disparaît pas après hyaluronidase.

Le fer colloïdal est plus franchement positif.

Obs. N° 6 - Liquide de plèvre

Pleurésie séro-fibrineuse typique chez un homme de 30 ans. Il existait un infiltrat controlatéral et des B.K. dans le produit d'expectoration. Le traitement associait Rifadine et Myambutol. Le frottis, très riche, est presqu'exclusivement lymphocytaire; il y a également quelques polynucléaires et quelques rares éléments mésothéliaux.

La fuschine paraldéhyde est négative. Il n'y a pas de cellules alcianophiles, ni à pH 1, ni à pH 2,6. Le problème de ce liquide est l'existence, entre les éléments cellulaires, d'une substance alcianophile.

Le fer colloïdal est négatif.

Obs. N° 7 - Liquide de plèvre

Malade de 68 ans, hospitalisé pour une opacité suspecte de l'apex gauche et une pleurésie hémorragique de la base gauche.

Bronchoscopie : épithélioma épidermoïde bronchique.

Le frottis est surtout hémorragique et inflammatoire. Il n'y a que quelques éléments mésothéliaux.

Les colorations cytochimiques n'ont rien montré sur ce liquide.

Tableau OBS. N° 5

Métachromasie	pH 1, 5	-
	pH 2,5	-
	pH 3,5	-
Bleu Alcian	pH 1	±
	pH 2,6	±
Bleu Alcian	Tampon	±
	Hyaluronidase	±
Müller Mowry		+
Fuschine paraldéhyde		-

Tableau Obs. N° 6

Métachromasie	pH 1,5	-
	pH 2,5	-
	pH 3,5	-
Bleu Alcian	pH 1	-
	pH 2,6	-
Bleu Alcian	Tampon	-
	Hyaluronidase	-
Fer colloïdal		-
Fuschine paraldéhyde		-

Obs. N° 8 - Liquide de plèvre - Dosage d'acide hyaluronique : 72 mg/l.

Il s'agit d'un malade d'une soixantaine d'années, dont le mésothéliome a été découvert à l'occasion d'un épanchement pleural droit récidivant.

La biopsie a montré une image histologique typique, papillaire, adénoïde et fusiforme. Elle a été faite par thoracotomie.

Un traitement radiothérapique a été fait quelques mois avant le prélèvement et le malade a récidivé sans traitement au moment où le prélèvement a été fait. Le liquide était visqueux.

Le frottis montre, à côté d'une composante inflammatoire peu importante, une composante mésothéliale prédominante.

La fuschine paraldéhyde est négative.

Le Bleu Alcian à pH 1 est négatif; le Bleu Alcian à pH 2,6 est très positif, surtout au niveau des membranes cellulaires.

Le Bleu Alcian à pH 2,6, après séjour dans le tampon, est positif.

Le Bleu Alcian après hyaluronidase est totalement négatif.

Le Müller Mowry est très positif.

On met donc en évidence, au niveau de ce liquide, de l'acide hyaluronique.

Tableau Obs. N° 7

Métachromasie	pH 1,5	-
	pH 2,5	-
	pH 3,5	-
Bleu Alcian	pH 1	-
	pH 2,6	-
Bleu Alcian pH 2,6	Tampon	-
	Hyaluronidase	-
Müller Mowry		-
Fuschine paraldéhyde		-

Tableau Obs. N° 8

Métachromasie	pH 1,5	-
	pH 2,5	-
	pH 3,5	-
Bleu Alcian	pH 1	-
	pH 2,6	+++
Bleu Alcian pH 2,6	Tampon	++
	Hyaluronidase	-
Müller Mowry		+++
Fuschine paraldéhyde		-

Obs. N° 9 - Liquide de plèvre

Malade de 40 ans, porteur d'un épanchement pleural gauche, dont la biopsie pleurale a affirmé l'étiologie tuberculeuse.

La cytologie est presqu'exclusivement lymphocytaire.

La fuschine paraldéhyde est négative.

Les deux Bleu Alcian sont négatifs, de même que le fer colloïdal.

Obs. N° 10 - Liquide de plèvre

Jeune homme de 32 ans, porteur d'un épanchement pleural droit, lié à un séminome testiculaire. L'autopsie de ce malade a parfaitement confirmé le diagnostic.

Le frottis montre, à côté d'éléments inflammatoires, l'existence de cellules rondes, plus grosses que des lymphocytes, avec un cytoplasme plus abondant, qui sont rattachées, étant donné le contexte, aux cellules séminomateuses.

Il n'y a aucune alcianophilie à pH 1, ni à pH 2,6.

Le fer colloïdal est très discrètement positif.

Tableau Obs. N° 9

Métachromasie	pH 1,5	-
	pH 2,5	-
	pH 3,5	-
Bleu Alcian	pH 1	-
	PH 2,6	-
Bleu Alcian pH 2,6	Tampon	-
	Hyaluronidase	-
Müller Mowry		-
Fuschine paraldéhyde		-

Tableau Obs. N° 10

Métachromasie	pH 1,5	-
	pH 2,5	-
	pH 3,5	-
Bleu Alcian	pH 1	-
	pH 2,6	-
Bleu Alcian pH 2,6	Tampon	-
	Hyaluronidase	-
Müller Mowry		±
Fuschine paraldéhyde		-

Obs. N° 11 - Liquide de plèvre

Ce malade a été opéré d'un cancer du colon transverse, de type lieberkühnien. Il y a une métastase hépatique clinique et un épanchement pleural droit.

La cytologie montre, à côté d'éléments inflammatoires, de nombreuses cellules en bague à châton.

La fuschine paraldéhyde est négative.

Les parois des cellules en bague à châton sont très peu alcianophiles à pH 1, plus alcianophiles à pH 2,6.

Après action de la hyaluronidase, les parois des cellules en bague à châton restent discrètement alcianophiles à pH 2,6, mais il y a incontestablement un saut de coloration entre le témoin et la coupe plongée dans la hyaluronidase.

Il s'agit là d'un liquide difficile, sur lequel nous reviendrons.

Le fer colloïdal est positif, mais faiblement au niveau de la paroi des cellules en bague à châton.

Il faut cependant noter que l'intensité des réactions est beaucoup moins importante que pour la lame des mésothéliomes.

Obs. N° 12 - Liquide pleural

Malade hospitalisé pour un épanchement pleural droit séro-hémorragique et récidivant. La biopsie pleurale a permis d'affirmer la malignité, sur l'existence de boyaux cellulaires, avec monstruosités nucléaires.

Le diagnostic de mésothéliome, un moment évoqué, a été formellement réfuté sur l'existence d'un taux d'acide hyaluronique très bas dans le liquide pleural (< 20 mg).

La cytologie montre, au sein d'un liquide très hémorragique, l'existence d'éléments inflammatoires et de cellules mésothéliales non irritatives.

La fuschine paraldéhyde est négative.

Il n'y a pas d'alcianophilie, ni à pH 1, ni à pH 2,6.

Le fer colloïdal est discrètement positif, au niveau de ces éléments mésothéliaux.

En résumé, l'étude du liquide pleural, si elle n'apporte pas d'arguments en faveur de l'étiologie de cet épanchement pleural manifestement malin, a le mérite de confirmer parfaitement le dosage de l'acide hyaluronique dans le liquide de plèvre.

Obs. N° 13 - Liquide pleural

Malade de 37 ans portugais, porteur d'une pleurésie tuberculeuse gauche, confirmée par la biopsie pleurale qui montre des images typiques.

Le frottis est riche, peu hémorragique, presqu'exclusivement lymphocytaire.

La fuschine paraldéhyde est négative.

Le Bleu Alcian est négatif, tant à pH 1 qu'à pH 2,6.

Le fer colloïdal est négatif.

Tableau Obs. N° 11

Métachromasie	pH 1,5	-
	pH 2,5	-
	pH 3,5	-
Bleu Alcian	pH 1	±
	pH 2,6	+
Bleu Alcian pH 2,6	Tampon	+
	Hyaluronidase	±
Müller Mowry		±
Fuschine paraldéhyde		-

Tableau Obs. N° 12

Métachromasie	pH 1,5	-
	pH 2,5	-
	pH 3,5	-
Bleu Alcian	pH 1	-
	pH 2,6	-
Bleu Alcian pH 2,6	Tampon	-
	Hyaluronidase	-
Fer colloïdal		±
Fuschine paraldéhyde		-

Obs. N° 14 - Liquide de plèvre

Il s'agit d'un malade jeune, porteur d'une pleurésie purulente, secondaire à une pneumopathie aiguë. Des diplocoques ont été retrouvés dans le liquide, qui a été prélevé pour cette observation, après quatre jours d'un traitement antibiotique. Le liquide était louche à la ponction.

La cytologie montre un liquide essentiellement inflammatoire, avec de nombreux polynucléaires, dont une grande partie est altérée, et des lymphocytes. La composante mésothéliale n'y est presque pas représentée.

Toutes les colorations cytochimiques sont négatives.

Obs. N° 15 - Liquide de plèvre

Malade de 72 ans, porteur d'une pleurésie gauche métastatique d'un cancer du sein opéré il y a quinze ans.

La cytologie montre, à côté de polynucléaires non altérés et de lymphocytes, une proportion importante de cellules mésothéliales comportant un cytoplasme spumeux. A côté de ces éléments, on note des cellules de taille moyenne, siège de franches monstruosités. La biopsie pleurale confirme l'infiltration de la plèvre par des cellules malignes se groupant autour de cavités glandulaires.

Il n'y a pas d'alcianophilie au niveau de ces éléments, tant à pH 1, qu'à pH 2,6.

Le fer colloïdal, s'il est positif au niveau des éléments inflammatoires, est négatif au niveau des cellules tumorales et des cellules mésothéliales.

Tableau Obs. N° 13

Métachromasie	pH 1,5	-
	pH 2,5	-
	pH 3,5	-
Bleu Alcian	pH 1	-
	pH 2,6	-
Bleu Alcian pH 2,6	Tampon	-
	Hyaluronidase	-
Fer colloïdal		-
Fuschine paraldéhyde		-

Tableau Obs. N° 14

Métachromasie	pH 1,5	-
	pH 2,5	-
	pH 3,5	-
Bleu Alcian	pH 1	-
	pH 2,6	-
Bleu Alcian pH 2,6	Tampon	-
	Hyaluronidase	-
Fer colloïdal		-
Fuschine paraldéhyde		-

Obs. N° 16 - Liquide de plèvre

Malade de 37 ans, porteur d'une pleurésie séro-fibrineuse typique. La biopsie pleurale a confirmé le diagnostic.

Le liquide est presqu'exclusivement lymphocytaire, avec quelques rares éléments mésothéliaux.

Toutes les colorations histochimiques sont négatives sur ce liquide.

Tableau Obs. N° 15

Métachromasie	pH 1,5	-
	pH 2,5	-
	pH 3,5	-
Bleu Alcian	pH 1	-
	pH 2,6	-
Bleu Alcian pH 2,6	Tampon	-
	Hyaluronidase	-
Fer colloïdal		-
Fuschine paraldéhyde		-

Tableau Obs. N° 16

Métachromasie	pH 1,5	-
	pH 2,5	-
	pH 3,5	-
Bleu Alcian	pH 1	-
	pH 2,6	-
Bleu Alcian pH 2,6	Tampon	-
	Hyaluronidase	-
Fer colloïdal		-
Fuschine paraldéhyde		-

Obs. N° 17 - Liquide d'ascite

Malade de 55 ans, porteur d'une ascite néoplasique, secondaire à une carcinose péritonéale diffuse. Le point de départ est un épithélioma papillaire de l'ovaire, dont le diagnostic a été affirmé par l'exploration chirurgicale et la biopsie.

Le culot de centrifugation est pauvre. Il est constitué, à côté d'éléments inflammatoires peu nombreux et de cellules mésothéliales, d'éléments cellulaires nucléolés. De rares éléments ont l'aspect de cellules en bague à chaton.

Les deux Bleu Alcian sont négatifs; le fer colloïdal, lui, est positif.

Les autres colorations n'ont rien montré.

Obs. N° 18 - Liquide de plèvre

Ce liquide pleural provient d'un deuxième prélèvement fait sur l'observation N° 2, malade de 70 ans, porteur d'un épithélioma colique et d'un épanchement métastatique pleural gauche.

La cytologie est tout à fait comparable. A côté de cellules inflammatoires, existent de nombreux éléments dont le noyau est repoussé par une vacuole centrale optiquement vide. Certains se regroupent en formant une ébauche de cavité glandulaire.

Le Bleu Alcian à pH 1 montre que certaines vacuoles sont alcianophiles; elles le restent à pH 2,6. La paroi cellulaire est également alcianophile.

La fuschine paraldéhyde est très positive, surtout au niveau de la fibrine. Les éléments intracellulaires cytoplasmiques ne prennent pas le colorant.

Il n'y a aucune digestion par la hyaluronidase.

Le fer colloïdal est également positif.

Une technique de lyse de l'acide sialique par hydrolyse acide a été faite sur cette lame, suivie d'un Bleu Alcian; la digestion a été quasiment complète.

Tableau Obs. N° 17

Métachromasie	pH 1,5	-
	pH 2,5	-
	pH 3,5	-
Bleu Alcian	pH 1	-
	pH 2,6	-
Bleu Alcian pH 2,6	Tampon	-
	Hyaluronidase	-
Fer colloïdal		+
Fuschine paraldéhyde		-

Tableau Obs. N° 18

Métachromasie	pH 1,5	-
	pH 2,5	-
	pH 3,5	-
Bleu Alcian	pH 1	++
	pH 2,6	++
Bleu Alcian pH 2,6	Tampon	++
	Hyaluronidase	++
Fer colloïdal		++
Fuschine paraldéhyde		++
Hydrolyse acide + Bleu Alcian		-

Obs. N° 19 - Liquide de plèvre

Malade de 70 ans, porteur d'un épithélioma papillaire végétant de l'ovaire, avec métastases pleurales droites. La biopsie pleurale a confirmé l'envahissement de la plèvre par des boyaux cellulaires malins.

La cytologie pleurale montre, à côté d'éléments inflammatoires assez peu nombreux, l'existence de grandes cellules au noyau bourgeonnant, dont certaines se regroupent en prenant une allure papillaire. Quelques unes de ces cellules présentent également une vacuole optiquement vide.

La fuschine paraldéhyde est négative.

Le Bleu Alcian à pH 1 est très discrètement positif.

Le Bleu Alcian à pH 2,6 est positif; il n'y a aucune digestion par la hyaluronidase.

Le fer colloïdal est très positif au niveau des éléments cellulaires tumoraux.

Une technique d'hydrolyse acide a été également faite sur cette lame et a permis une disparition quasi complète de l'alcianophilie.

Obs. N° 20 - Liquide de plèvre

Malade de 27 ans, porteur d'une pleurésie séro-fibrineuse droite d'origine tuberculeuse, confirmée par biopsie pleurale.

La cytologie pleurale est presqu'exclusivement lymphocytaire; quelques polynucléaires non altérés sont, en outre, observés.

Toutes les colorations cytochimiques sont négatives.

Tableau Obs. N° 19

Métachromasie	pH 1,5	-
	pH 2,5	-
	pH 3,5	-
Bleu Alcian	pH 1	±
	pH 2,6	++
Bleu Alcian pH 2,6	Tampon	++
	Hyaluronidase	++
Miller Mowry		+++
Fuschine paraldéhyde		-
Hydrolyse acide + Bleu Alcian		-

Tableau Obs. N° 20

Métachromasie	pH 1,5	-
	pH 2,5	-
	pH 3,5	-
Bleu Alcian	pH 1	-
	pH 2,6	-
Bleu Alcian pH 2,6	Tampon	-
	Hyaluronidase	-
Fer colloïdal		-
Fuschine paraldéhyde		-
Hydrolyse acide + Bleu Alcian		+

Obs. N° 21 - Liquide de plèvre

Malade de 65 ans, porteur d'un mésothéliome pleural authentifié par biopsie chirurgicale. Ce mésothéliome évolue depuis un an. Il n'y a pas eu de chimiothérapie intrapleurale, ni de dosage de l'acide hyaluronique. Par contre, le liquide est visqueux.

La cytologie montre, à côté d'un contingent inflammatoire, l'existence de grosses cellules mésothéliales à cytoplasme spumeux et présentant des signes cytologiques de malignité.

Il n'y a pas d'alcianophilie à pH 1, mais des cellules alcianophiles surtout au niveau des membranes à pH 2,6.

Cette alcianophilie persiste dans le tampon, est digérée par la hyaluronidase.

Le fer colloïdal est très positif.

Les résultats sont donc tout à fait comparables à ceux de l'Obs. N° 8.

Obs. N° 22 - Liquide de plèvre

Il s'agit d'un malade atteint d'un mésothéliome papillaire. La cytologie montre, à côté de quelques éléments inflammatoires, des cellules mésothéliales présentant des caractères cytologiques de malignité.

Il n'y a aucune alcianophilie à pH 1. Par contre, les cellules mésothéliales sont alcianophiles à pH 2,6, surtout au niveau de leur cytoplasme où les éléments alcianophiles apparaissent granuleux.

Cette alcianophilie n'est pas complètement digérée par la hyaluronidase, mais il existe un saut de coloration très net. Le fer colloïdal est très positif au niveau des éléments mésothéliaux.

Cette observation est donc comparable aux Obs. N° 8 et 21.

Le dosage de l'acide hyaluronique dans ce liquide était : 118 mg/l.

Tableau Obs. N° 21

Métachromasie	pH 1,5	-
	pH 2,5	-
	pH 3,5	-
Bleu Alcian	pH 1	-
	pH 2,6	++
Bleu Alcian pH 2,6	Tampon	++
	Hyaluronidase	-
Fer colloïdal		-
Fuschine paraldéhyde		-
Hydrolyse acide + Bleu Alcian		+

Tableau Obs. N° 22

Métachromasie	pH 1,5	-
	pH 2,5	-
	pH 3,5	-
Bleu Alcian	pH 1	-
	pH 2,6	+
Bleu Alcian pH 2,6	Tampon	+
	Hyaluronidase	-
Fer colloïdal		++
Fuschine paraldéhyde		-

Obs. N° 23 - Liquide de plèvre

Liquide pleural provenant d'un mésothéliome papillaire. La cytologie montre, à côté de cellules inflammatoires, de nombreuses hématies et de volumineuses cellules dont certaines sont nucléolées.

Les colorations cytochimiques montrent l'absence d'alcianophilie à pH 1. Par contre, il existe une alcianophilie à pH 2,6; elle a été digérée par la hyaluronidase. Le fer colloïdal est positif.

Il faut noter que les deux dernières observations ne donnent pas d'aussi belles images que les deux autres mésothéliomes (N° 8 et N° 21). En effet, ces lames ont été techniquées sur des blocs fixés au liquide de Bouin; nous reviendrons sur ces problèmes de fixation dans la discussion.

Dosage de l'acide hyaluronique dans ce liquide : 106 mg/l.

Tableau Obs. N° 23

Métachromasie	pH 1,5	-
	pH 2,5	-
	pH 3,5	-
Bleu Alcian	pH 1	-
	pH 2,6	+
Bleu Alcian pH 2,6	Tampon	+
	Hyaluronidase	-
Fer colloïdal		+
Fuschine paraldéhyde		-
Hydrolyse acide + Bleu Alcian		+

RECAPITULATION

OBSERVATIONS	Métachromasie au Bleu de Toluidine			Bleu Alcian		Bleu Alcian pH 2,6		Fer colloïdal	Fuschine paraldéhyde	Hydrolyse acide + Bleu Alcian
	pH 1,5	pH 2,5	pH 3,5	pH 1	pH 2,6	Tampon	Hyaluronidase			
1 P. Sarcome	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
2 P. Epithélioma colique	-	-	-	++	++	++	++	++	-	2
3 A. Cancer primitif bronchique	-	-	-	-	+	+	+	++	-	3
4 A. Epithélioma colique	-	-	-	++	++	++	++	++	-	4
5 A. Epithélioma gastrique	-	-	-	±	±	±	±	+	-	5
6 P. Tuberculose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
7 P. Cancer primitif bronchique	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7
8 P. Mésothéliome	-	-	-	-	+++	++	-	+++	-	8
9 P. Tuberculose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9
10 P. Séminome testiculaire	-	-	-	-	-	-	-	±	-	10
11 P. Epithélioma colique	-	-	-	±	+	+	±	±	-	11
12 P. Hyalur. 20 mg Pleurésie maligne	-	-	-	-	-	-	-	±	-	12
13 P. Tuberculose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13
14 P. Pleurésie purulente	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14
15 P. Cancer mammaire	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15
16 P. Tuberculose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16
17 A. EOA papillaire de l'ovaire	-	-	-	-	-	-	-	+	-	17
18 P. Epithélioma colique	-	-	-	++	++	++	++	++	-	- 18
19 P. Epithélioma ovarien	-	-	-	±	++	++	++	++	-	- 19
20 P. Tuberculose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
21 p. Mésothéliome	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+ 21
22 P. Mésothéliome	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+ 22
23 P. Mésothéliome	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+ 23

ANALYSE DES RESULTATS OBTENUS

POUR CHAQUE COLORATION UTILISEE

I - LA METACHROMASIE au BLEU de TOLUIDINE à DIFFERENTS pH (1,5-2,5-3,5)

Cette technique avait été retenue parce que de réalisation facile et qu'elle permettait de différencier l'acide hyaluronique qui n'est métachromatique qu'à pH 3,5 et au-dessus des autres mucopolysaccharides, en particulier des mucopolysaccharides sulfatés dont la métachromasie ne se manifeste qu'aux pH inférieurs.

Les données concernant cette métachromasie sont, par contre, contradictoires, comme l'indiquent GANTER et JOLLE.

Ce qui semble établi, c'est que pour que cette métachromasie soit retrouvée, il faut que la concentration en acide hyaluronique soit élevée (WISLOCK, 1947).

Quant à nous, cette technique s'est révélée être un échec. Dans aucun de nos mésothéliomes, nous ne l'avons observée. Par ailleurs, ces colorations ont été également faites sur tous les autres liquides, en particulier sur les métastases des épithéliomas d'origine digestive. Aucune vacuole, aucune bordure cellulaire n'ont pris la métachromasie. JAGUEUX avait d'ailleurs eu les mêmes difficultés pour ses liquides de plèvre et il n'avait observé de métachromasie qu'au niveau des fragments tissulaires, qu'il s'agisse de pièces de biopsie chirurgicale ou de pièces d'autopsies.

II - LA COLORATION par le BLEU ALCIAN (Photos 1 à 5)

La réaction au Bleu Alcian nous a donné de bons résultats. Elle a été faite à différents pH et présente bien sûr l'avantage de pouvoir être conservée, contrairement à la métachromasie.

Le Bleu Alcian a été utilisé à pH 1 pour mettre en évidence les substances mucopolysaccharidiques sulfatées.

Il a été utilisé à pH 2,5 pour mettre en évidence les mucopolysaccharides acides carboxyliques et, en particulier, l'acide hyaluronique et l'acide sialique.

Dans les 4 mésothéliomes étudiés, la coloration est positive à pH 2,5; cette positivité se localise soit au biveau des bordures cytoplasmiques, soit au niveau des vacuoles, soit en petits grains au niveau du cytoplasme.

D'autres liquides ont une alcianophilie nette à pH 2,5 : ce sont les liquides 2, 3, 4, 5, 11, 18 et 19. Ces liquides correspondent à des épithéliomas d'origine digestive ou ovarienne. L'un d'eux est un liquide d'ascite répondant à une métastase d'un carcinome épidermoïde. Ce sont les cellules mésothéliales qui prennent le Bleu Alcian à pH 2,5; à pH 1, l'alcianophilie n'est observée dans aucun mésothéliome.

Par contre, les mêmes liquides 2, 4, 5, 11, 18 et 19 présentent une alcianophilie à ce pH; il s'agit des liquides d'épithéliomas glandulaires. Ceci est, en effet, caractéristique des

mucopolysaccharides sulfatés présents au niveau des muqueuses colique ou gastrique normales et des épithéliomas glandulaires muco-sécrétants.

Il faut noter que les cellules mésothéliales irritatives ne prennent pas le Bleu Alcian à pH 1 (liquide N° 3).

L'étude de la répartition des zones alcianophiles montre qu'il n'y a pas de différence entre les cellules mésothéliales tumorales et celles des épithéliomas glandulaires muco-sécrétants (vacuoles, membranes, grains).

L'interprétation est parfois rendue difficile, du fait de l'existence d'une alcianophilie de la fibrine; mais un examen attentif permet de différencier une alcianophilie cytoplasmique ou de membrane d'une alcianophilie fibrineuse. Une fibrinolyse ou un prélèvement sur EDTA-Iniprol éviterait peut-être cet inconvénient.

Il faut enfin noter que parfois les cellules mésothéliales non tumorales sont discrètement alcianophiles; cette alcianophilie, très peu intense et inconstante, n'est pas digérée par la hyaluronidase testiculaire; nous le reverrons.

III - LA REACTION au FER COLLOIDAL (Photos 6 à 9)

Faite suivant la technique de Müller Mowry (1958), cette méthode est basée sur l'affinité des ions ferriques pour les groupes acides.

Cette réaction est positive dans les 4 mésothéliomes

de façon très intense. Elle est retrouvée par ailleurs positive dans les observations 2, 3, 4, 5, 10, 11, 12, 17, 18 et 19.

La répartition de la coloration au niveau cellulaire est tout à fait comparable à celle du Bleu Alcian. Il faut cependant noter ;

a) Que, dans l'ensemble, cette coloration ne nous a pas apporté plus que la coloration au Bleu Alcian à pH 1 et 2,6 (elle est positive aussi bien pour les sialomucines que pour l'acide hyaluronique et c'est là, nous le verrons, le problème essentiel).

b) Qu'elle donne une coloration souvent intense de la fibrine, ce qui gêne parfois l'interprétation cytologique.

c) Qu'elle colore parfois certains éléments inflammatoires.

Elle a cependant parfaitement confirmé les résultats du Bleu Alcian.

IV - EPREUVE D'HYDROLYSE à la HYALURONIDASE (Photos 10 à 15)

Elle exige la confrontation de 3 coupes :

. La coupe Bleu Alcian à pH 2,6.

. Une coupe témoin laissée dans le tampon, colorée par le Bleu Alcian à pH 2,6.

. Une coupe placée dans la solution d'hyaluronidase, puis colorée par le Bleu Alcian à pH 2,6.

L'hyaluronidase testiculaire utilisée hydrolyse, outre l'acide hyaluronique, la chondroïtine et les acides chondroïtine - sulfurique A et C. L'alcianophilie disparaît donc après contact de

cet enzyme, mais il est plus efficace pour l'acide hyaluronique que pour les mucopolysaccharides sulfatés.

On obtient, dans tous les mésothéliomes une digestion complète par l'hyaluronidase.

Le seul liquide, qui pose par ailleurs des problèmes, est le liquide N° 11; on observe, en effet, au niveau de certaines cellules, une alcianophilie à pH 2,6, qui disparaît après action de la hyaluronidase. Cette alcianophilie est beaucoup moins importante que dans les mésothéliomes. Ce liquide est considéré comme "douteux", ce qui confirme certaines données de la littérature (KUND, RASMUSSEN, FABER), qui retrouvent également de faibles quantités d'acide hyaluronique dans certains liquides.

Il faut signaler, enfin, que dans un liquide (N° 12) et dans les mésothéliomes, les techniques cytochimiques ont confirmé les données de la biologie. Le diagnostic étiologique de la pleurésie N° 12 reste en suspens, mais la technique a permis de confirmer l'absence d'acide hyaluronique dans le liquide.

Enfin, l'alcianophilie à pH 1 et pH 2,6 des épithéliomas digestifs et ovariens n'est pas digérée par la hyaluronidase.

V - LA FUSCHINE PARALDEHYDE

Cette coloration est caractéristique des mucopolysaccharides sulfatés, en particulier des chondroïtine sulfatés A, B et C.

Réalisée avec la technique d'Elftman, elle ne s'est révélée positive que dans un cas; mais seule la substance extra-cellulaire a pris le colorant.

En tout cas, aucun constituant intra-cellulaire n'a été coloré par la fuschine paraldéhyde. Ceci est théoriquement en contradiction avec les résultats du Bleu Alcian à pH 1; mais ce genre de divergence est assez courant en histochimie des mucopolysaccharides, les résultats dépendant souvent de la fixation employée.

VI - L'HYDROLYSE ACIDE

Cette technique d'hydrolyse acide modérée, suivie d'une coloration par le Bleu Alcian, a été faite pour 5 liquides (N° 18, 19, 21, 22 et 23); elle a permis de confirmer (21, 22 et 23) que l'acide hyaluronique n'était pas éliminé par cette hydrolyse, tandis que l'alcianophilie diminue de façon très notable (Obs. N° 18 et 19), dans un cas de métastase de cancer colique et un cas d'épithélioma papillaire végétant de l'ovaire. Ceci permet de prouver que l'alcianophilie a pH 2,6 de ces cellules est due à l'acide sialique, du moins en partie.

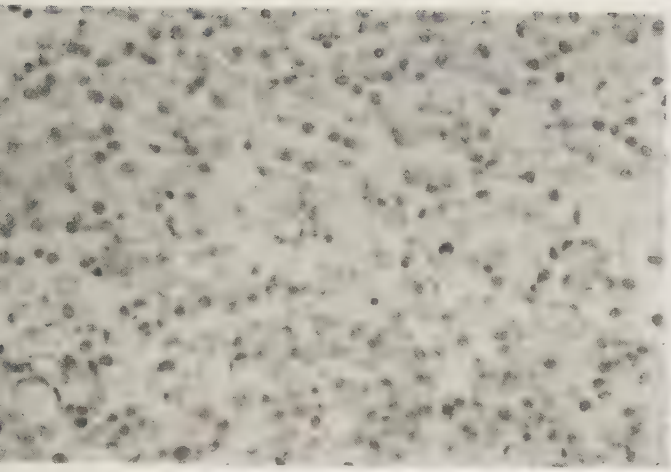
La persistance d'une alcianophilie discrète est sans doute due à des mucopolysaccharides sulfatés, non détruits par l'hydrolyse acide.

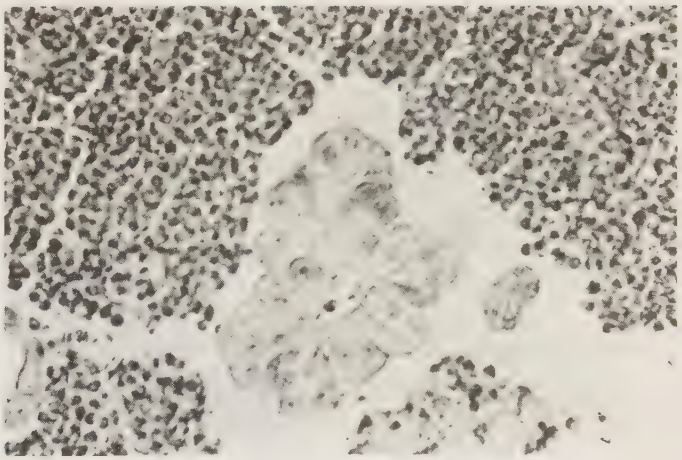
Fig. 1 - Col. Bleu Alcian à pH 1. - Liquide de plèvre : cytologie (Obs. N° 8) - Mésothélioma à différenciation papillaire et adénoïde. Dosage de l'acide hyaluronique : 72 mg/l. Il n'y a aucune alcianophilie au niveau des cellules mésothéliales tumorales, qui sont très vacuolisées.

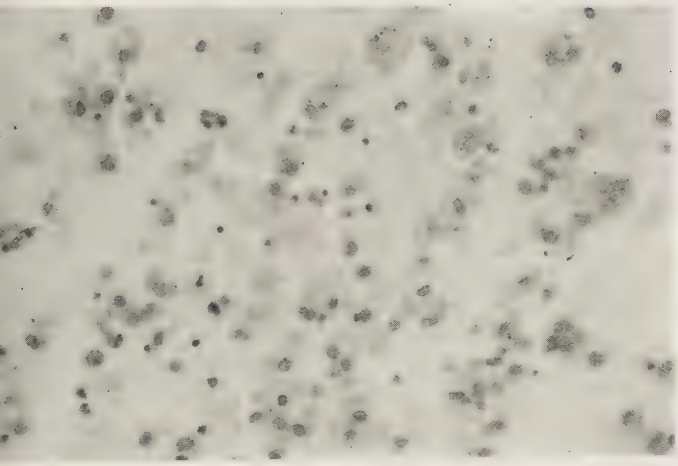
Fig. 2 - Col. Bleu Alcian à pH 1. Liquide de plèvre : cytologie. (Obs. N° 2). Métastase pleurale d'un épithélioma colique primitif lieberkühnien. Présence dans le culot de cellules comportant une volumineuse vacuole alcianophile.

Fig. 3 - Col. Bleu Alcian à pH 2,6. - Liquide d'ascite. Très discrète alcianophilie des cellules mésothéliales de ce liquide, secondaire à un épithélioma bronchique primitif.

FiG. 4 - Col. Bleu Alcian à pH 2,6. Liquide de plèvre. Mésothéliome à différenciation papillaire et adénoïde (acide hyaluronique : 72 mg/l). Très forte alcianophilie au niveau tant du cytoplasme que de la membrane cellulaire (Obs. N° 8).







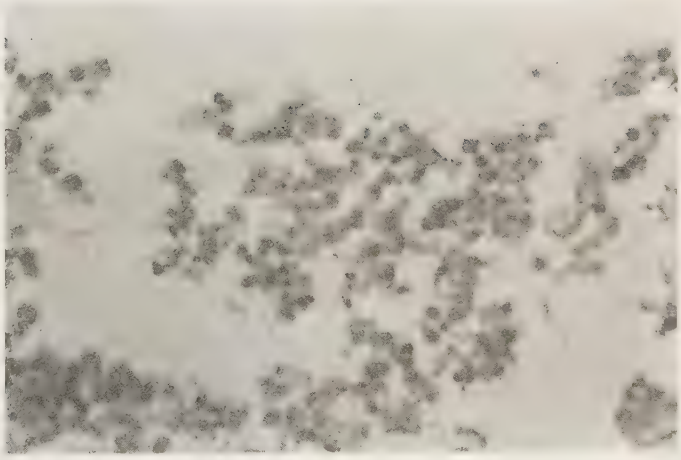
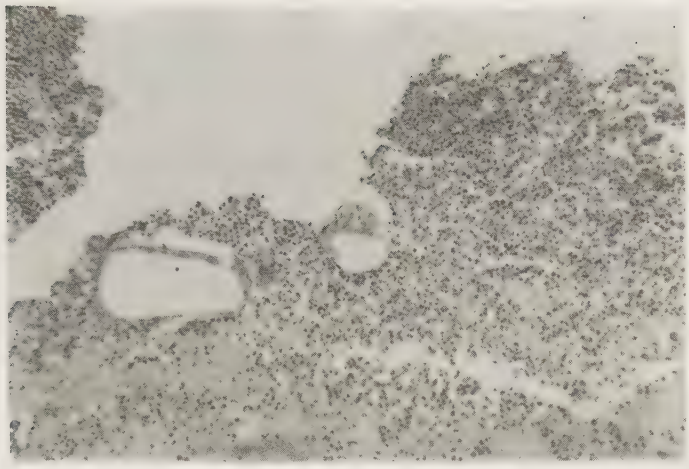
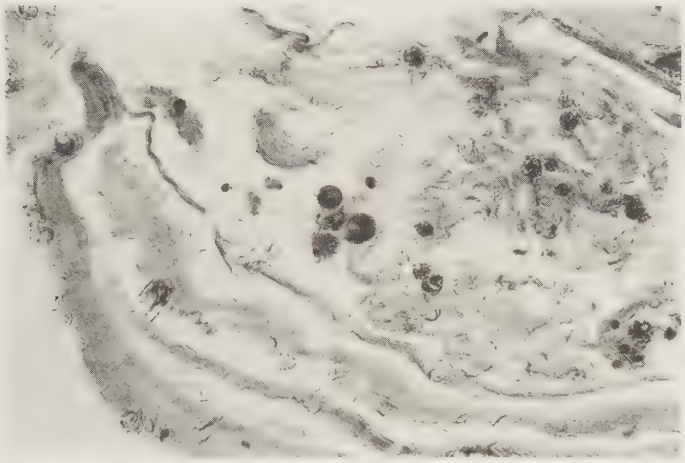


Fig. 5 - Col. Bleu Alcian à pH 2,6. - Liquide de plèvre. Métastase d'un épithélioma lieberkühnien du colon. Noter l'alcianophilie très nette au niveau de la membrane et des vacuoles intracytoplasmiques.

Fig. 6 - Col. Fer colloïdal. - Liquide de plèvre. Mésothéliome à différenciation papillaire et adénoïde. Les cellules mésothéliales de ce liquide sont très intensément colorées. Noter également que la fibrine a pris très intensément la coloration.

Fig. 7 - Col. Fer colloïdal. - Liquide de plèvre. Mésothéliome à différenciation adénoïde et papillaire. Les cellules mésothéliales prennent très intensément la coloration (obs. N° 8).





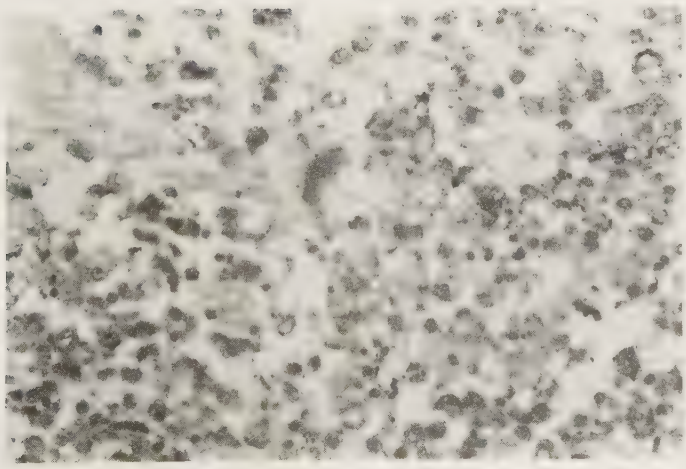
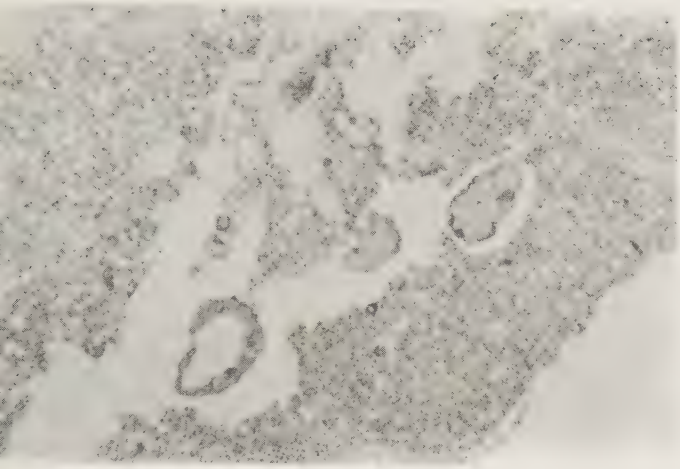


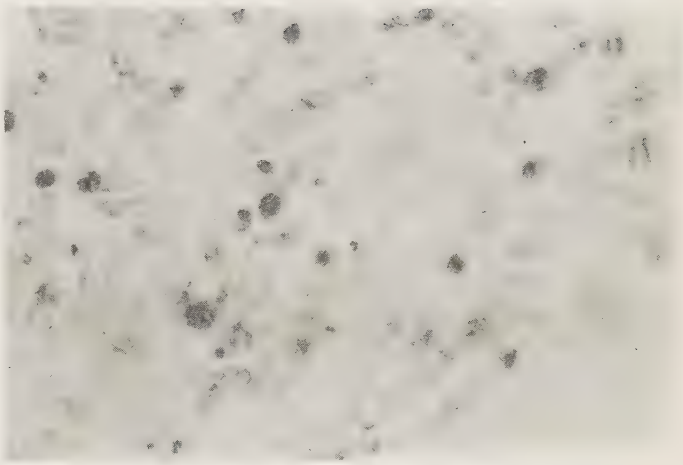
Fig. 8 - Col. Fer colloïdal. - Liquide de plèvre. Métastase d'un épithélioma lieberkühnien du colon. Les cellules prennent intensément le colorant au niveau de leur membrane et de vacuoles intracytoplasmiques.

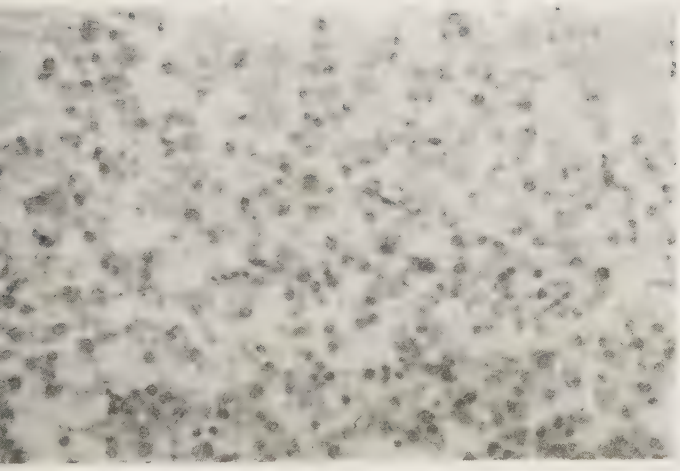
Fig. 9 - Col. Fer colloïdal. - Liquide de plèvre. Cellules mésothéliales irritatives. Elles prennent le fer colloïdal, moins intensément que les cellules mésothéliales tumorales (métastases péritonéales d'un épithélioma bronchique).

Fig. 10 - Col. Bleu Alcian à pH 2,6. - Liquide de plèvre. (Coupe laissée dans le tampon). Nette alcianophilie au niveau des cellules mésothéliales tumorales. Il s'agit de l'Obs. N° 8 (cf Fig. 4).

Fig. 11 - Col. Bleu Alcian à pH 2,6 + Tampon.- Liquide de plèvre. Mésothéliome à différenciation adénoïde et papillaire. Alcianophilie nette au niveau des parois des cellules mésothéliales tumorales.







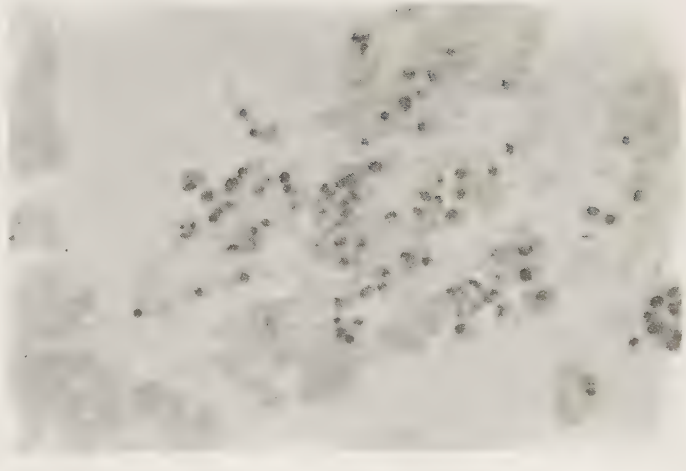
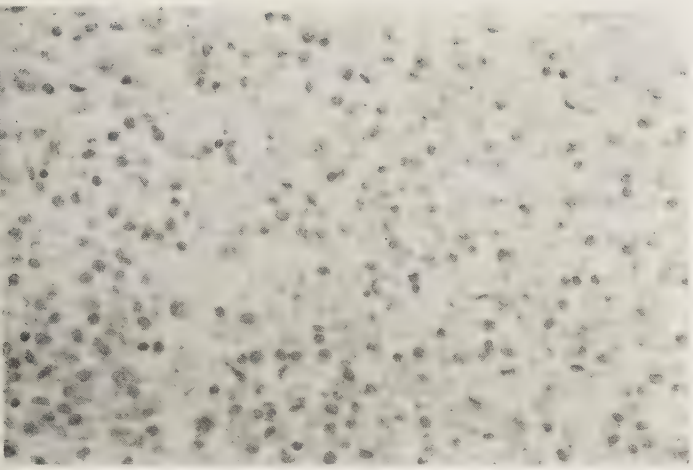


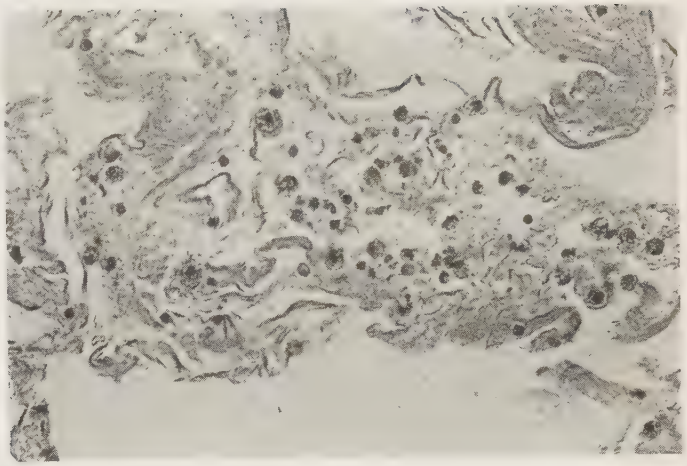
Fig. 12 - Col. Bleu Alcian à pH 2,6, après hyaluronidase. - Liquide de plèvre Obs. N° 8. Disparition complète de l'alcianophilie au niveau des cellules mésothéliales tumorales.

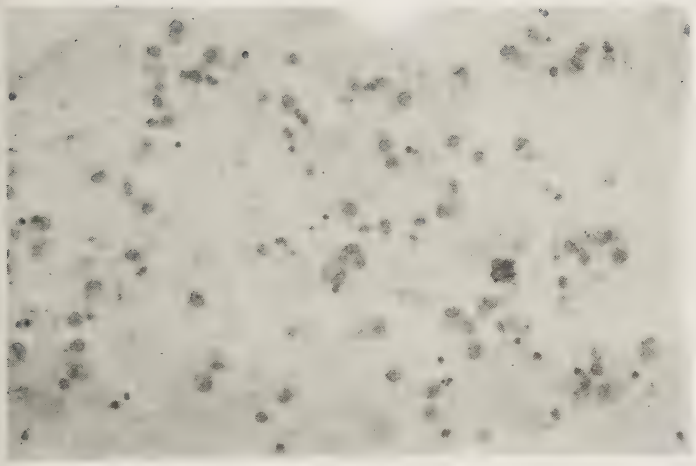
Fig. 13 - Col. Bleu Alcian à pH 2,6, après hyaluronidase. - Liquide de plèvre Obs. N° 21. Disparition complète de l'alcianophilie des membranes des cellules mésothéliales tumorales.

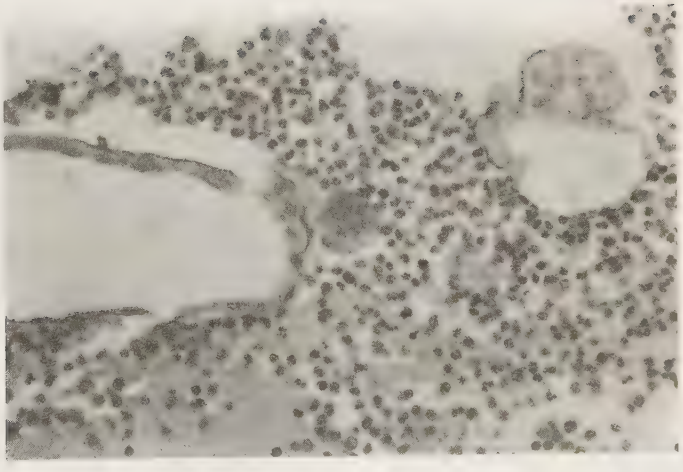
Fig. 14 - Liquide d'ascite. Létastase d'un épithélioma bronchique primitif. Col. Bleu Alcian à pH 2,6 + hyaluronidase. La faible alcianophilie dans les cellules mésothéliales irritatives n'est pas digérée par la hyaluronidase.

Fig. 15 - Liquide de plèvre - Métastase d'un épithélioma lieberkühnien primitif du colon. Col. Bleu Alcian à pH 2,6 + hyaluronidase. L'alcianophilie très nette des cellules tumorales n'est pas digérée par la hyaluronidase.









D I S C U S S I O N G E N E R A L E

Au terme de cette analyse, on peut retenir les points suivants :

1°) Elle confirme que les cellules mésothéliales des mésothéliomes pleuraux malins sécrètent de l'acide hyaluronique, puisque leur produit de sécrétion alcianophile est digéré par la hyaluronidase testiculaire et qu'aucun mucopolysaccharide sulfaté n'a été mis en évidence dans ces liquides.

2°) Il a été mis en évidence, dans certains liquides métastatiques d'épithéliomas digestifs et ovariens, des mucopolysaccharides sulfatés.

3°) Les pleurésies tuberculeuses (6, 9, 13, 16 et 20), sont caractéristiques par la négativité de toutes les réactions cytochimiques.

4°) Pour ce qui est du cancer bronchique, les 2 observations sont différentes :

- La première est un liquide d'ascite, à forte composante mésothéliale; mais l'alcianophilie à pH 2,6 des cellules mésothéliales n'est pas digérée par la hyaluronidase; il faut noter qu'elle est très peu intense.
- Pour la deuxième, c'est un liquide de plèvre et toutes les colorations sont négatives.

5°) Pour les métastases d'adénocarcinomes, soit digestifs soit ovariens, il est souvent mis en évidence de l'acide sialique et de façon formelle dans 2 observations (18 et 19), où l'hydrolyse acide a pu être faite. Ils peuvent également (cf paragraphe 1), contenir des mucopolysaccharides sulfatés.

6°) Corrélation entre la positivté des réactions observées et le dosage de l'acide hyaluronique dans le liquide : cette corrélation qui a pu être établie pour 3 liquides de mésothéliomes et pour un quatrième non encore étiqueté sur le plan étiologique, a été parfaite. Nous avons malheureusement un faux positif (liquide N° 11), pour lequel nous n'avons pas de dosage; mais il faut bien noter que l'intensité de l'alcianophilie est beaucoup moins importante que dans les mésothéliomes et que cette alcianophilie siège principalement au niveau des éléments cellulaires inflammatoires.

7°) Quant au rôle du traitement sur ces réactions histochimiques, il faut noter que le plus "positif" était une récidive, alors que ce malade ne recevait aucun traitement depuis quelques mois. Ceci semble concorder avec les travaux de BOERSMA qui note une chute du taux de l'acide hyaluronique au cours du traitement radiothérapique ou antimitotique, surtout lorsque ce dernier est administré par voie intra-pleurale.

8°) Reste enfin la nature chimique des mucopolysaccharides mis en évidence dans cette étude.

Nous n'avons retrouvé aucun mucopolysaccharide, autre que l'acide hyaluronique dans les mésothéliomes pleuraux. L'hydrolyse a toujours été complète. Il faut cependant bien préciser que le prélèvement utilisé n'a pas de rapport avec un tissu tumoral et qu'il ne s'agit que d'un culot de centrifugation.

DUTHOIT et BOERSMA avaient noté, dans leurs Thèses, qu'il existait, à côté de l'acide hyaluronique, du Dermatane-Sulfate, ou chondroïtine sulfate B. La fuschine paraldéhyde est toujours restée négative, de même que le Bleu Alcian à pH 1.

Le lieu de fabrication de ce mucopolysaccharide est d'ailleurs inconnu. Peut-être se synthétise-t-il à l'intérieur même du liquide de plèvre, sans participation tumorale ou cellulaire? Il ne s'agit bien sûr là que d'une pure hypothèse, d'autant plus que certaines données semblent prouver que l'hydrolyse des pièces par l'hyaluronidase est parfois incomplète.

Pour d'autres liquides, on peut raisonnablement conclure :

a) Qu'il existe de l'acide sialique au niveau des métastases des épithéliomas mucoïdes d'origine gastrique ou ovarienne.

b) Et qu'à côté de l'acide sialique, existent également des mucopolysaccharides sulfatés, responsables de l'alcianophilie à pH 1, mais qui, curieusement, ne prennent pas la fuschine paraldéhyde.

9°) Les données de cette étude confirment les difficultés de mettre en évidence, de façon formelle, en histochimie, les mucopolysaccharides acides et l'existence possible de divergences notables entre les diverses colorations. Cependant, nous verrons dans quelle mesure et, étant donné les colorations et la fixation employées, on peut proposer de simplifier la méthode pour la rendre utilisable en routine.

C O N C L U S I O N S

Le travail que nous avons fait a permis de mettre en évidence des mucopolysaccharides dans les épanchements des séreuses coelomiques par des techniques histochimiques. Il nous permet de faire les conclusions suivantes que nous diviserons en 4 parties :

1) Conclusions techniques.
2) Conclusions concernant les mésothéliomes.
3) Conclusions concernant les liquides témoins et, en particulier, les carcinomes glandulaires métastatiques.
4) Application possible de la méthode.

1) CONCLUSIONS TECHNIQUES

La technique de caractérisation histochimique de l'acide hyaluronique et des autres mucopolysaccharides est simple et ne nous a pas posé de problèmes particuliers, en dehors de l'échec de la métachromasie et de la fuschine paraldéhyde. Elle exige, cependant, onze lames par liquide, ce qui fait beaucoup pour une méthode de routine, L'analyse des résultats permet de simplifier notablement le protocole, des résultats identiques étant obtenus avec le protocole suivant :

a) Hématoxyline-Phloxine-Safran de contrôle.

b) Bleu Alcian avec 2 pH (1 et 2,5).

Au terme de ce protocole, deux possibilités :

- Il n'y a aucune cellule alcianophile : il est inutile de poursuivre.

- Il y a des cellules alcianophiles : on fait alors, d'une part une épreuve à la hyaluronidase (2 lames), d'autre part une épreuve d'hydrolyse acide pour digérer éventuellement l'acide sialique (1 lame).

Cette technique simple qui supprime les lames colorées par la fuschine paraldéhyde, le fer colloïdal et le Bleu de Toluidine (métachromasie à pH 1,5 - 2,5 - 3,5), est beaucoup plus accessible à une technique de routine éventuelle (3 lames pour un liquide "négatif", 5 à 6 lames pour un liquide "positif").

Sur le plan technique, il faut également signaler l'importance de la fixation et, surtout, d'une fixation rapide. Le fixateur "Formol Nitrate de Plomb Alcool de Lillie", nous a donné toute satisfaction; cependant, nous avons parfois été gênés pour l'Hématoxyline-Phloxine-Safran par la présence de grains de plomb; ceux-ci sont solubles aux pH acides et ne gênent pas les colorations cytochimiques.

2) CONCLUSIONS CONCERNANT LES MESOTHELIOMES

Elles ne font que confirmer les données apportées par la biochimie et l'histochimie des tumeurs pleurales primitives malignes. Ce sont les cellules mésothéliales tumorales desquamées qui présentent une alcianophilie nette à pH 2,6, digérée par la hyaluronidase. La topographie de cette alcianophilie (surtout au

niveau de la membrane cellulaire, plus accessoirement au niveau des granulations cytoplasmiques), évoque un processus de sécrétion qu'il faudrait contrôler par des études en microscopie électronique. Celles faites à ce sujet par STOEBNER et Coll. montrent :

a) que la cellule mésothéliale de base ne synthétise vraisemblablement pas d'acide hyaluronique et que si certains ont pu en trouver dans les liquides de plèvres inflammatoires, il provenait du tissu conjonctif sous-mésothélial (ceci est peut-être confirmé dans notre étude par un faux positif, l'alcianophilie que nous avons retrouvée siégeait, en effet, quasi exclusivement sur les cellules inflammatoires).

b) Que la cellule mésothéliale tumorale était d'une grande plasticité morphologique et qu'elle était capable de synthétiser l'acide hyaluronique.

Quant aux autres mucopolysaccharides signalés par les biochimistes dans les liquides de mésothéliomes, nous n'avons pu les mettre en évidence.

3) CONCLUSIONS CONCERNANT LES AUTRES LIQUIDES ET LES CARCINOMES GLANDULAIRES MUCO-SECRETANTS METASTATIQUES

- Les colorations utilisées n'ont pas permis de mettre en évidence de mucopolysaccharides dans les liquides tuberculeux.

- Dans un liquide (N° 3), nous avons trouvé, au niveau de cellules mésothéliales de type irritatif, une substance très légèrement alcianophile à pH 2,6 et restant alcianophile après action de la hyaluronidase.

- Quant aux métastases des épithéliomas muco-sécrétants, elles ont montré des faits intéressants, à savoir la mise en évidence possible de mucopolysaccharides appartenant aux mucines sur les culots de centrifugation.

- Nous pensons que la présence de tels aspects permet de faire un diagnostic pratiquement certain de métastase d'épithélioma muco-sécrétant.

4) APPLICATION POSSIBLE DE LA METHODE

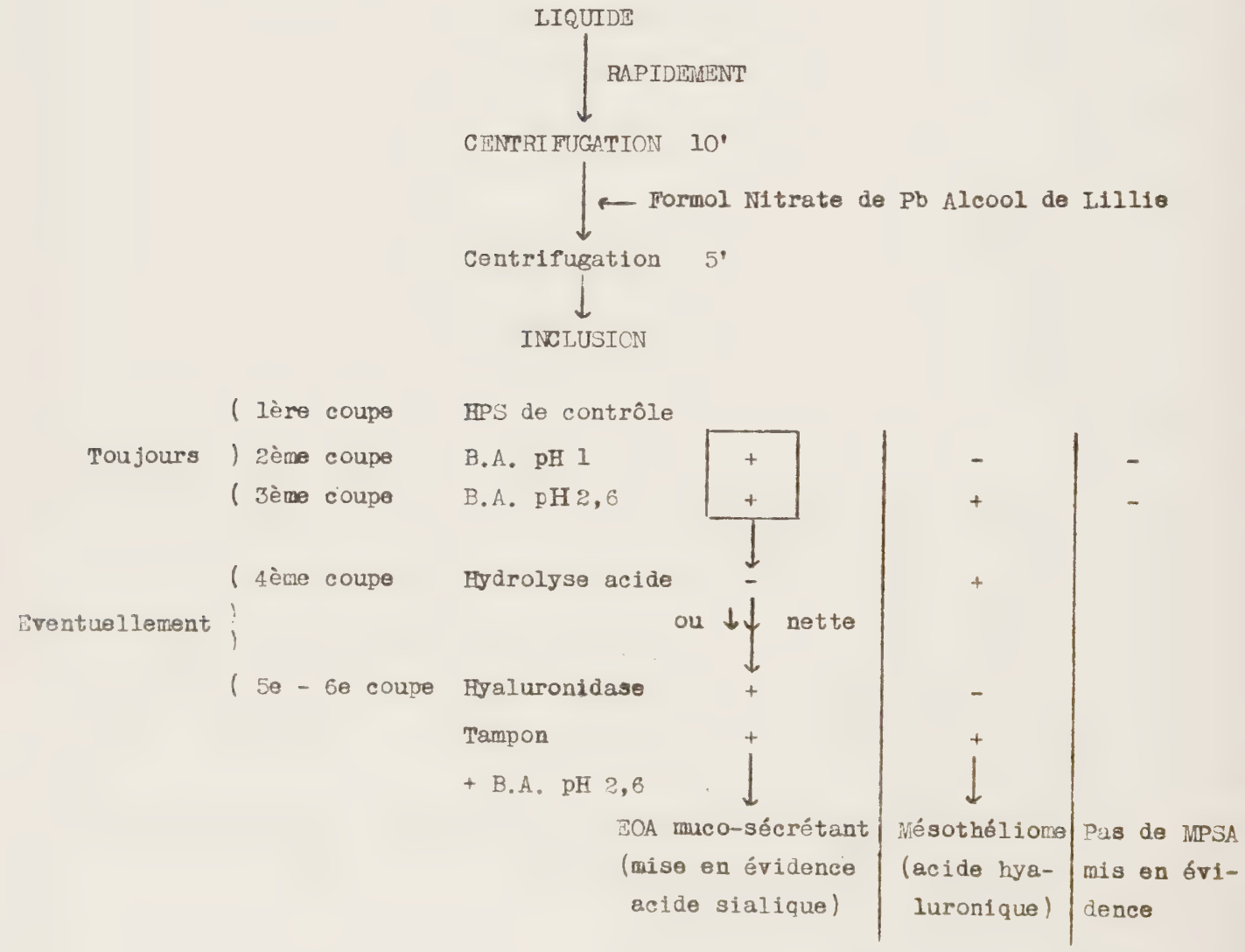
Nous proposons une technique simplifiée qui semble utilisable comme technique de routine.

Comme toute technique cytologique, elle n'a de valeur que si l'on met en évidence, au niveau des cellules, soit mésothéliales malignes, soit métastatiques d'épithéliomas glandulaires muco-sécrétants, des zones fortement alcianophiles, disparaissant soit après hyaluronidase (acide hyaluronique), soit après hydrolyse acide (acide sialique).

Elle permet, enfin, de différencier les cellules mésothéliales vacuolisées irritatives des cellules en bague à châton.

En effet, la cellule en bague à chaton "prend" le Bleu Alcian aux 2 pH et l'alcianophilie n'est pas digérée par la hyaluronidase, mais par l'hydrolyse acide, tandis que la cellule mésothéliale irritative ne prend pas ou prend très faiblement le Bleu Alcian (et uniquement à pH 2,6).

Nous résumerons la méthode proposée par le schéma suivant :



-=-=-=-=-=-=-=-

-=-=-

-=-

Lu et approuvé.

Le Président de Thèse :

Professeur L. ORCEL

Lu et approuvé.

Le Doyen de la Faculté de Médecine St-ANTOINE :

Professeur J. LOYGUE

Vu et permis d'imprimer.

Le Recteur de l'Académie de Paris :

R. MALLET

B I B L I O G R A P H I E

1 - BIEHL F. - Contribution à l'étude des tumeurs primitives de la plèvre - Thèse Nancy, N° 11, 1957.

2 - BLIX G. - Hyaluronic acid in the pleural and peritoneal fluids, from a case of mesothelioma. - Acta Soc. Med. Uppsala, 1951, 56, 47-50.

3 - BOERSMA A. - L'acide hyaluronique dans le diagnostic des mésothéliomes pleuraux. - Thèse Lille, 1970.

4 - BOUVIER L.M., PAILLAS J. et CALVET E. - Sur le diagnostic anatomopathologique des mésothéliomes pleuraux (identification des mésothéliomes malins à différenciation histiocytaire). Journ. Fr. Méd. Chir. Thor., 1970, 24, 87-100.

5 - CASTELAIN G.C., PRETET S. et KREIS B. - Cyto-diagnostic des mésothéliomes pleuraux. - Presse Médicale, 1969, 77, 197-199.

6 - DARNIS F. et FAUVERT R. - Mésothéliome péritonéal diffus (ascite visqueuse récidivante riche en acide hyaluronique. Traitement par la radiothérapie et Radio-Or : échec). - Bull. Mens. Soc. Méd. Hôp. Paris, 1966, 72, 483-493.

7 - DELARUE J. et LAUMONIER R. - Anatomie-Pathologique. - Flammarion édit. 1969, Tome I, 659-667.

8 - DUTHOIT A. - Etude des glucoprotéïdes des épanchements pleuraux. Thèse Médecine Lille, 1966.

9 - DWOSKIN S. - Mesothelioma of the peritoneum. A case report in which the asctic fluid contained hyaluronic acid. - Ann. Int. Med., 1954, 49, 809-811.

10 - GANTER P. et JOLLE G. - Histochimie normale et pathologique. - Tome I et II - Gauthier-Villars édit., 1969 et 1970.

11 - HARRINGTON J.S., WAGNER J.C. et SMITH M. - The detection of hyaluronic acid in pleural fluid of cases with diffuse pleural mesotheliomas. - Brit. J. Exp. Path., 1963, 44, 81-83.

12 - HAVEZ R., TACQUET A., BISERTE G., FOISSAC-GEGOUX Ph., DEGAND P., LELIEVRE G., GOSSELIN B. et DUTHOIT A. - Le diagnostic biochimique du mésothéliome pleural. - Lille Médical, 1967, 12, 460-466.

13 - HAVEZ R., DEGAND P., BOERSMA A. et RICHET. - Clinica - Chimica Acta, 1971, 33, 443-454.

14 - JAGUEUX M., PIERON R. et COSSET J.M. - Données actuelles sur les mésothéliomes malins de la plèvre. Caractérisation histochimique de l'acide hyaluronique. - Communication à la Société de Pathologie Respiratoire, 12 juin 1971 (à paraître).

15 - KOURILSKY R., KALMANSON D., VERLEY J.M. et PIERON R. - Les mésothéliomes pleuraux. - Coeur et Médecine Interne, 1966, 5, 51-68.

16 - LE BRIGAND J. et Col. - Les tumeurs de la plèvre - Cahiers de Médecine, 1971, 6, 447.

17 - LEGRAND M., PARIENTE R., ANDRE J. (Mme), CHRETIEN J. et BROUET G. - Ultrastructure de la plèvre pariétale humaine. - La Presse Médicale, 25 déc. 1971, 79, N° 55, 2515-2520.

18 - MAXIMOW A. - Ueber das Mesothelium und die Zellen der Serösen Exsudate. - Arch. Exp. Zellforsch, 1927, 4, 1-12.

19 - MEYER K. - Biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase. - Physiol. Rev. 1947, 27, 335-359.

20 - MEYER K. & CHAFFEE E. - Hyaluronic acid in pleural fluid associated with a malignant tumor involving the pleura and peritoneum. J. Biol. Chem. 1940, 1333, 83-91.

21 - MIECH G., STOEBNER P., WITZ J.P., MORAND G., ROEGEL E. et OUDET P.- Etude anatomo-clinique de 10 mésothéliomes pleuraux diffus (Apport de la microscopie électronique). - Journ. Franç. Méd. Chir. Thor., 1970, 24, 105-118.

22 - MOWRY R.W. - The special value of methods that color both acidic and vicinal hydroxyl groups in the histochemical study of mucins with revised directions for the colloïdal iron stain, the use of alcian blue BGX and their combinations with P.A.S. reaction. - Ann. N.Y. Acad. Sci., 1963, 106, 402-423.

23 - PIERON R., KOURILSKY S., PLOT S. LEVAME M., VALTY J., DECROIX G. et KOURILSKY R. - Sur les mésothéliomes du péricarde. A propos d'un cas personnel. - Bull. Mens. Soc. Méd. Hôp. Paris, 1963, 114, 187-206.

24 - RASMUSSEN K. et FABER V. - Hyaluronic acid in 247 pleural fluids. Scand. J. Resp. Dis., 1967, 48, 366-371.

25 - ROUJEAU J. - Les tumeurs primitives de la plèvre. - Cahiers de Médecine, 1971, 6, 465.

26 - SANO M.E., WEISS E. et GAULT E.S. - Pleural mesothelioma. Further history of its histogenesis. - J. Thor. Surg., 1950, 19, 783-794.

27 - SICARD A., MARSAN C. (Mme) et PAGES A. - Atlas de Cytologie. Tome III, 1968, édit. Varia.

28 - STOEBNER P., MIECH G. et SENGEL A. - Notions d'ultrastructure pleurale.-I - L'hyperplasie mésothéliale. - Presse Médicale, 1970, 78, 1179-1184.

-II - Les mésothéliomes. - Presse Médicale, 1970, 78, 1403-1408.

29 - STOUT A.P. et MURRAY M.R. - Localised pleural mesothelioma. Investigation of its characteristics and histogenesis by method of tissue culture. - Arch. Path. Chicago, 1942, 34, 951.

30 - SYLVEN B. et MALMGREN H. - On alleged metachromasia of hyaluronic acid. - Lab. Invest., 1952, 1, 413-431.

31 - TACQUET A., BISERTE G., HAVEZ R., HILTENBRAND, FOISSAC-GEGOUX P. et LELIEVRE G. - Critères biochimiques du diagnostic de mésothéliome pleural. - Lille Médical, 1965, 146-155.

32 - TRUEDSON E. - A case of mesothelioma of the pleural and peritoneum producing hyaluronic acid. - Acta Soc. Med. Uppsala, 1951, 56, 39-45.

33 - WAGNER J.C., MUNDAY D.E. et HARRINGTON J.S. - Histochemical demonstration of hyaluronic acid in pleural mesothelioma. - J. Path. Bact., 1962, 84, 73-78.

34 - WINSLOW D.J. et TAYLOR M.B. - Malignant peritoneal mesotheliomas. A Clinico-pathological analysis of 12 fatal cases. - Cancer Phil., 1960, 13, 127-136.

35 - WISLOCKI G.B., BUNTING H. et DEMPSEY E.W. - Metachromasia in mammalian tissues and its relationship to mucopolysaccharides. - Amer. J. Anat., 1947, 81, 1.

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 1

METHODES UTILISEES 5

MATERIEL D'ETUDE 9

OBSERVATIONS PERSONNELLES 11

ANALYSE DES RESULTATS OBTENUS POUR
CHAQUE COLORATION UTILISEE 37

DISCUSSION GENERALE 53

CONCLUSIONS 57

-=-=-=-=-=-=-=-

-=-=-

-=-